

日本人クローン病感受性遺伝子TNFSF15多型の機能解析

著者	植木 紳夫
号	78
学位授与番号	2646
URL	http://hdl.handle.net/10097/45872

氏 名（本籍）	うえ 植	き 木	のぶ 紳	お 夫
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 2 6 4 6 号			
学位授与年月日	平 成 21 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻			
学 位 論 文 題 目	日本人クローン病感受性遺伝子 <i>TNFSF15</i> 多型の 機能解析			

	(主 査)			
論 文 審 査 委 員	教授 下瀬川	徹	教授 佐々木	巖
	教授 松 原 洋 一			

論文内容要旨

【目 的】

クローン病は、その発症に遺伝因子が関与しており、2005年に Yamazaki らは日本人クローン病と強い相関を示す遺伝子として *TNFSF15* を報告した。強い相関を認めた *TNFSF15* 領域近傍の6つの一塩基多型 (SNP) は強い連鎖不平衡状態にあり、2つの主要なハプロタイプ (クローン病リスクアリル/非リスクアリル) を構成していた。2007年に Kakuta らは、刺激されたヒト末梢血 T 細胞で、クローン病リスクアリル由来の mRNA が非リスクアリル由来の mRNA に比べて発現が増加している事を示した。本研究では、Yamazaki や Kakuta らの報告に基づき *TNFSF15* 遺伝子の 5' 領域に存在し強い相関を示した2つの SNP, rs7848647 (−638 G/A), rs6478109 (−358 T/C) に注目して、その機能解析を行った。なお、リスクアリルは−638 A/−358 C, 非リスクアリルは−638 G/−358 T の組み合わせである。

【方 法】

T 細胞系培養細胞 Jurkat を用いて、アリル別に *TNFSF15*-mRNA の発現量を比較した。リスクアリル由来と非リスクアリル由来の 5' 領域塩基配列を種々の長さで挿入したプラスミドを作成し、Jurkat 細胞, U937 細胞, HeLa 細胞にトランスフェクション後、Dual-Luciferase 法にてプロモーターアッセイを行った。転写因子の存在を確認するために Electoric mobile shift assay (EMSA) を行い、また、TFMATRIX データベースにて転写因子結合配列を検索し、予測された転写因子に対する抗体を用いて、Supershift assay を行った。

【結 果】

刺激下 Jurkat 細胞で *TNFSF15*-mRNA 発現が上昇し、リスクアリル由来の mRNA が優位の allelic imbalance の状態であることを確認した。プロモーターアッセイでは、2つの SNP の内、刺激下 Jurkat 細胞で−358 C アリルが−358 T アリルに比較し、有意に転写活性が高いことを確認した。非刺激時には、C アリルと T アリル間で転写活性に差を認めなかった。U937 細胞や HeLa 細胞ではプラスミド間でのプロモーター活性の差は確認されなかった。EMSA の結果では、刺激下 Jurkat 細胞の核蛋白では、−358 T を含むプローブにおいて明瞭なシフトバンドを認め、−358 C を含むプローブでは弱いシフトバンドを認めた。他の細胞株からの核蛋白ではシフトバンドを確認できなかった。

【結 論】

TNFSF15 遺伝子多型の中で、少なくとも rs6478109 (−358 T/C) が regulatory SNP として働いている事が強く示唆された。−358 C アリル (リスクアリル) は −358 T アリル (非リスクアリル) と比較して、刺激時 T リンパ球において *TNFSF15* の転写活性が高いことにより、疾患感受性を高めていることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

〔目的〕 クローン病は、その発症に遺伝因子が関与しており、2005年に Yamazaki らは日本人クローン病と強い相関を示す遺伝子として *TNFSF15* を報告した。強い相関を認めた *TNFSF15* 領域近傍の6つの一塩基多型 (SNP) は強い連鎖不平衡状態にあり、2つの主要なハプロタイプ (クローン病リスクアリル/非リスクアリル) を構成していた。2007年に Kakuta らは、刺激されたヒト末梢血 T 細胞で、クローン病リスクアリル由来の mRNA が非リスクアリル由来の mRNA に比べて発現が増加している事を示した。本研究では、Yamazaki や Kakuta らの報告に基づき *TNFSF15* 遺伝子の 5' 領域に存在し強い相関を示した2つの SNP, rs7848647 (−638 G/A), rs6478109 (−358 T/C) に注目して、その機能解析を行った。なお、リスクアリルは −638 A/−358 C, 非リスクアリルは −638 G/−358 T の組み合わせである。

〔方法〕 T 細胞系培養細胞 Jurkat を用いて、アリル別に *TNFSF15*-mRNA の発現量を比較した。リスクアリル由来と非リスクアリル由来の 5' 領域塩基配列を種々の長さで挿入したプラスミドを作成し、Jurkat 細胞, U937 細胞, HeLa 細胞にトランスフェクション後、Dual-Luciferase 法にてプロモーターアッセイを行った。転写因子の存在を確認するために Electoric mobile shift assay (EMSA) を行い、また、TFMATRIX データベースにて転写因子結合配列を検索し、予測された転写因子に対する抗体を用いて、Supershift assay を行った。

〔結果〕 刺激下 Jurkat 細胞で *TNFSF15*-mRNA 発現が上昇し、リスクアリル由来の mRNA が優位の allelic imbalance の状態であることを確認した。プロモーターアッセイでは、2つの SNP の内、刺激下 Jurkat 細胞で −358 C アリルが −358 T アリルに比較し、有意に転写活性が高いことを確認した。非刺激時には、C アリルと T アリル間で転写活性に差を認めなかった。U937 細胞や HeLa 細胞ではプラスミド間でのプロモーター活性の差は確認されなかった。EMSA の結果では、刺激下 Jurkat 細胞の核蛋白では、−358 T を含むプローブにおいて明瞭なシフトバンドを認め、−358 C を含むプローブでは弱いシフトバンドを認めた。他の細胞株からの核蛋白ではシフトバンドを確認できなかった。

〔結論〕 *TNFSF15* 遺伝子多型の中で、少なくとも rs6478109 (−358 T/C) が regulatory SNP として働いている事が強く示唆された。−358 C アリル (リスクアリル) は −358 T アリル (非リスクアリル) と比較して、刺激時 T リンパ球において *TNFSF15* の転写活性が高いことにより、疾患感受性を高めていることが示唆された。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。